

⑨日本国特許庁
公開特許公報

⑩特許出願公開
昭53—34987

⑪Int. Cl.²
C 12 D 13/06

識別記号
1 0 5

⑫日本分類
36(2) D 251

庁内整理番号
7110—49

⑬公開 昭和53年(1978)3月31日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 5 頁)

⑭L-アミノ酸の製造方法

⑮特 願 昭51—107287

⑯出 願 昭51(1976)9月9日

(特許法第30条第1項適用 昭和51年4月4日
日社団法人日本農芸学会において発表)

⑰発 明 者 緒方浩一

京都市左京区吉田河原町14 マ

ンハイム鴨川220

⑱発 明 者 谷吉樹

京都市北区上賀茂菟蒲園町56

同

和泉好計

枚方市御殿山南町4—3615

⑲出 願 人 谷吉樹

京都市北区上賀茂菟蒲園町56

⑳代 理 人 弁理士 後藤道生

明 細 書

1. 発明の名称

L-アミノ酸の製造方法

2. 特許請求の範囲

メタノールを主炭素源とする増地にメチロモナス(Methylomonas)属に属し、メタノールよりL-ロイシンまたはL-バリンを生産する能力を有する微生物を好氣的に培養し、培養液中に生成蓄積したL-ロイシンまたはL-バリンを採取することを特徴とするL-アミノ酸の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

この発明はL-アミノ酸の製造方法に関する。詳しくは、メタノールを主炭素源とする発酵法によるL-ロイシンまたはL-バリンの製造法に関する。

安価にして大量に入手可能なメタノールを主炭素源としてL-アミノ酸を発酵法により製造する方法はすでにいくつかの報告がある。

本発明者等はメチロモナス(Methylomonas)

属の微生物のうちよりすぐれたL-ロイシンまたはL-バリンの生産能を有する微生物を見出し、この知見に基づいて本発明を完成した。

本発明の方法において用いる微生物は、メチロモナス属に属し、メタノールよりL-ロイシンまたはL-バリンを生産する能力を有するものである。例えば以下の微生物がある。

メチロモナス・アミノファシエンス 77a (FERM-P 3703)
(M.aminofaciens)

メチロモナス・アミノファシエンス D 704 (FERM-P 3705)

メチロモナス・アミノファシエンス M 325 (FERM-P 3704)

メチロモナス・アミノファシエンス 77a は本発明者等が分離、同定した新菌株であり以下の菌学的性質を有する。

実験方法はM. .Pelczar;Manual of Microbiological Method(1957), RY. Stanier et al.;J.Gen. Microbiol. 43, 159-271, Marmur, J&P.Doty;J.Mol.Biol.5, 109-118に記載の方法によつた。

検索は Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th ed. (1974)に従った。

(a) 形態学的性質

- (1) 細胞の形および大きさ：0.4~0.5 μ × 1.5~3 μ
- (2) 細胞の多形性の有無：なし
- (3) 運動性の有無鞭毛の着生状態：あり、極鞭毛
- (4) 胞子：なし
- (5) グラム染色性：陰性
- (6) 抗酸性：陰性

(b) 各培地における生育状態

- (1) 肉汁寒天平板培養：生育しない
- (2) メタノール含有肉汁寒天平板培養：中等の生育、円形、半レンズ状、全縁、均質白色~淡黄色透明湿光色素生成しない。
- (3) 肉汁寒天斜面培養：生育しない。
- (4) メタノール含有肉汁寒天斜面培養：中等の生育、薄膜状、糸状、湿光、平滑物質
- (5) 肉汁液体培養：生育しない。

(3)

地でもー

- (8) クエン酸の利用：Koser 培地ー (メタノールを添加すると生育する。)
Christensen 培地ー
- (9) 無機窒素源：硝酸塩 ++ (メタノール添加培地で)
アンモニウム塩 ++ (メタノール添加培地で)
- (10) 色素の生成：ー
- (11) ウレアーゼ：+ (メタノール添加培地で)
- (12) オキシダーゼ：+
- (13) カタラーゼ：+
- (14) 生育の範囲：温度 11℃ ~ 38.5℃ で生育する 39.6℃ では生育しない。
pH 4~10.6 の範囲で生育する。
- (15) 酸素に対する態度：好気性通性嫌気性 (メタノール YE 培地、
メタノール NaNO₃ 培地)
- (16) O-F テスト：酸を生成しない。
- (17) 糖類から酸およびガスの生成の有無

(5)

特開 昭53-34987 (2)

- (3) メタノール含有肉汁液体培養：均一に濁る。表面生育しない。
- (4) 肉汁セラチン穿刺培養：生育しない。
- (5) メタノール含有肉汁セラチン穿刺培養：生育するが液化しない。
- (6) リトマス・ミルク：変化なし
- (7) B.C.P. ミルク：変化なし

(c) 生理学的性質

- (1) 硝酸塩の還元：メタノールを添加した培地では +++
- (2) 脱窒反応：メタノールを添加した培地でもー
- (3) M R テスト：ー
- (4) V P テスト：メタノールを添加した培地では + (pH 5.2)
- (5) インドールの生成：メタノール含有培地でもー
- (6) 硫化水素の生成：メタノール含有培地でもー
- (7) デンプンの加水分解：メタノール含有培

(4)

酸の生成

ガスの生成

L-アラビノース	ー	ー
D-キシロース	ー	ー
D-グルコース	ー	ー
D-マンノース	ー	ー
D-フラクトース	ー	ー
D-ガラクトース	ー	ー
麦芽糖	ー	ー
ショ糖	ー	ー
乳糖	ー	ー
トレハロース	ー	ー
D-ソルビット	ー	ー
D-マンニット	ー	ー
イノシット	ー	ー
グリセリン	±	ー
デンプン	ー	ー
ラフィノース	ー	ー
アドニット	ー	ー
サリシン	ー	ー
ズルシット	ー	ー
ラムノース	ー	ー

(6)

(18) デカルボキシラーゼ反応 (Møllerの方法)

リジン	-
オルニチン	-
アルギニン	-

(19) アルギニン ジヒドロラーゼ反応 (Stanier et alの方法) :-

(20) カゼインの分解性 :-

(21) Poly- β -hydroxybutyrate の蓄積の有無 : あり

(22) 炭水化合物の発化性 (Stanier et al Medium)

L-アラビノース	-	プロピレングリコール	-
D-キシロース	-	ツイン80	-
D-グルコース	-	レブリン酸カルシウム	-
D-フラクトース	-	シトラコン酸ソーダ	-
シロ糖	-	メソ酒石酸ソーダ	-
トレハロース	-	2,3-ブチレングリコール	-
D-ソルビット	-	メタ安息香酸ソーダ	-
イノシット	-	パラ安息香酸ソーダ	-
エリスリトール	-	DL-乳酸ソーダ	-
セロビオース	-	マロン酸ソーダ	-

メタノール	+++	コハク酸ソーダ	-
エタノール	-	酢酸ソーダ	-
2-ケトグルコン酸カルシウム	-	酒石酸ソーダ	-
アドニトール	-	アルギニン	-
グラニコール	-	プロピオン酸ソーダ	-
L-バリン	-	ラク酸ソーダ	-
β -アラニン	-	チヌステロン	-
パントテン酸カルシウム	-	トリブタミン	-
DL- β -ハイドロキシブチレート	-	ベタイン	-
メタン	-	ギ酸ソーダ	-
メタノールアミン	-	ホルムアルデヒド	-
グリセリン	-	α -ケトグルタル酸ソーダ	-

(a) DNAの GC含量 : 52.4%

(i) 本菌はi) グラム陰性桿菌。

ii) 鞭毛を有する。

iii) メタノールを唯一の炭素源として生育する。

iv) DNA-GC含量が52.4%であるところから *Methylobacterium* 属に属する。

(7)

(2) 種について検索すると

Bergey's Manual 第8版の *Methylobacterium* 属には *M. methanica*, *M. methanooxidans*, *M. methanitritificans* の3菌種が記載されている。

この3菌種と本菌を比べると第1表から明らかな如く異なる。

i) *M. methanica* はコロニーの色調がピンクであり、メタンを酸化することができ、有機化合物により生育阻害を受け、37℃で生育できず、生育 pH 範囲が 6.6~8.0 とせましく、Poly- β -hydroxybutyrate を細胞内に蓄積しない。しかし本菌はコロニーの色調が白色ないし淡黄色でありメタンを酸化せず、有機化合物により生育阻害を受けず37℃で生育できて生育 pH 範囲が 4~10.6 と広く、Poly- β -hydroxybutyrate を蓄積するので *M. methanica* と異なる。

ii) *M. methanooxidans* は細胞の大きさが1

(8)

$\times 1.5 \sim 3 \mu$ であり、Rosettesを形成し、メタンを酸化することができ、有機化合物により生育阻害を受け pH 範囲が 5~7 とせまい。

しかし本菌は細胞の大きさが $0.4 \sim 0.5 \times 1.5 \sim 3 \mu$ であり、Rosetteを形成せず、メタンを酸化することができず、有機化合物により生育阻害を受けず、生育 pH 範囲も 4~10.6 と広いので *M. methanooxidans* とは異なる。

iii) *M. methanitritificans* は細胞の大きさが $1 \sim 2 \times 2 \sim 4 \mu$ であり、コロニーの色調がライトイエローであり、メタンと窒素ガスを利用することができる。

しかし本菌は細胞も小さくコロニーの色調も白色ないし淡黄色であり、メタンも窒素ガスも利用することができないので *M. methanitritificans* とは異なる。

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 第8版 (1974)

' 1 7 2

た培地 3 ml を 10 ml 容の試験管に入れ、更に第 2 表に示す薬剤を同表に示す量添加し殺菌した。

これに第2表に示す微生物を接種し、28℃で24時間振盪培養した。生育量を培養液の吸光度を測定して定め、相対生育量を求めた。結果を第2表に示す。

第 2 段 (1)

ノルロイシン (mg/ml)	相 对 生 育 量	
	77a	D 704
5.0	0.0	81
1.0	73	98
0.5	96	100
0	100	100

第 2 表 (2)

ノモリノ (sq/ul)	相 対 生 育 量	
	77a	M 325
2.0	0.0	91
1.0	13	95
0.5	96	97
0	100	100

(1 3)

特 大 昭 53-34987 (4)

(3) 本箇の同定

Bergey's Manual 第 8 版の分類体系で本菌の検索を行うと、(2)で述べた如く本菌は形態的、培養的生理的諸性質に於て既知菌種のすべてと相違点が多く一致しない。

よつて本菌は *Methylomonas* 属に属する
新種と認めた。

メチロモナス・アミノプアシエンス D 704 は 77 Ⅲ より誘導したノルロイシンに耐性を有する変異株である。またメチロモナス・アミノプアシエンス M 325 は 77 Ⅲ より誘導したノルバリンに耐性を有する変異株である。

これらの薬剤耐性変異株の薬剤に対する耐性割合を示す実験例を以下に示す。

実験例

メチノール 2 g/dl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3 g/dl
 KH_2PO_4 0.2 g/dl, NaCl 0.1 g/dl および MgSO_4
 $7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g/dl を含み、pH 7.4 に調整し

(1 2)

本発明の微生物を培養する培地は、メタノールを主炭素源として含有する以外は、通常の窒素源、無機塩、その他の有機微量栄養素を含有する通常の培地である。窒素源としてはアンモニアガス、アンモニウム塩等が用いられる。

培養中メタノールは通常追補添加される。培養は好氣的条件がよく、培養温度は20℃ないし40℃が望ましい。培養の際培養液のpHを5ないし8に調節すれば通常最も望ましい結果が得られる。

かくして培養 2 ないし 10 日後には培養液中に L-ロイシンまたは L-バリンが生成蓄積するので、これを常法により培養液より分離採取する。

实施例 1

メチノール 2g/dl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3g/dl,
 KH_2PO_4 0.2g/dl, NaCl 0.1g/dl および HgSO_4
 $7\text{H}_2\text{O}$ 0.02g/dl を含む増地の 20 ml を 500
 ml 容量付フラスコに入れ殺菌した。

(1 4)

これに第3表に示す微生物を接種し、28℃で8日間培養した。培養の間第2日目、第3日目にそれぞれ1g/mlずつメタノールを添加した。培養液中には第3表に示す量のL-ロイシンまたはL-バリンが蓄積した。

第 3 表

菌 株	L-ロイシン (mg/ml)	L-バリン (mg/ml)
77a	0.25	0.20
D704	0.64	—
M325	0.60	0.85

特許出願人 谷 吉 樹

代 理 人 後 藤 道 生

(1 5)